

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



13 SEP 2004

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. September 2003 (18.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2003/076932 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/50**,
33/68, C12Q 1/37, C12N 15/62, 15/10

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2003/002611**

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. März 2003 (13.03.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
102 11 063.8 13. März 2002 (13.03.2002) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **AXARON BIOSCIENCE AG** [DE/DE]; Im Neuen-
heimer Feld 515, 69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ROSSNER, Moritz**
[DE/DE]; Pfaffenstück 49, Nikolausberg, 37077 Göttingen
(DE). **LAAGE, Rico** [DE/DE]; Leutershäuserstrasse 9,
69198 Schriesheim (DE). **NAVE, Klaus-Armin** [DE/DE];
Popitzweg 8, 37075 Göttingen (DE). **GRÜNEWALD,**
Sylvia [DE/DE]; Max-Reger-Str.2, 69121 Heidelberg
(DE).

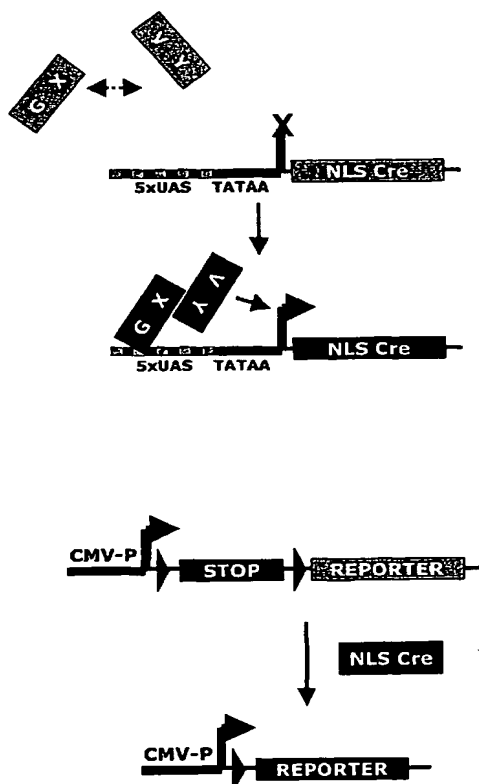
(74) **Anwalt: ISENBRUCK, Günter**; Isenbruck-Bösl-
Hörschler-Wichmann-Huhn, Theodor-Heuss-Anlage 12,
68165 Mannheim (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **NOVEL METHOD FOR DETECTING AND ANALYZING PROTEIN INTERACTIONS IN VIVO**

(54) Bezeichnung: **DETEKTION UND ANALYSE VON PROTEIN-INTERAKTIONEN IN VIVO**



(57) **Abstract:** The invention relates to a method for detecting and analyzing protein interactions in a cell, comprising the following steps: a) providing the activity of at least one enzyme selected from the group consisting of recombinases and proteases in the cell following a protein interaction; b) continued generation of an active reporter protein in the respective cell following the enzyme activity from step a) for a period of time exceeding that of the protein interaction from step a), and; c) producing a detection signal using the reporter proteins generated in b). The invention also relates to reverse configurations of the above method for detecting and analyzing protein interactions in a cell, whereby following the induced dissociation of a defined interaction between proteins, the activity of at least one enzyme selected from the group consisting of recombinases and proteases is provided in the cell and is converted into a permanent detection signal of the cell. The invention additionally relates to cells that express the inventive protein constituents, and to kits that provide the inventive protein constituents at the DNA level in the form of suitable expression vectors and, optionally, suitable transfectable or infectable cells. The provided cells can optionally express individual inventive protein constituents in a stable or transient manner.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion und Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle umfassend die folgenden Verfahrensschritte a) Bereitstellen der Aktivität mindestens eines Enzyms aus der Gruppe der Rekombinasen und Proteasen in der Zelle als Folge

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2003/076932 A3



KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

2. September 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

einer Protein-Interaktion, b) andauernde Generierung eines aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle als Folge der Enzymaktivität aus Schritt a), für einen Zeitraum, der über die Dauer der Protein-Interaktion aus Schritt a) hinausgeht, c) Erzeugung eines Detektionssignals durch die in b) generierten Reporterproteine. Die Erfindung betrifft weiterhin reverse Ausführungsformen des obigen Verfahrens zur Detektion und Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle, wobei als Folge der induzierten Dissoziation einer definierten Interaktion zwischen Proteinen die Aktivität mindestens eines Enzyms aus der Gruppe der Rekombinasen und Proteasen in der Zelle bereitgestellt und in ein permanentes Detektionssignal der Zelle umgesetzt wird. Die Erfindung betrifft ausserdem Zellen, die die erfindungsgemässen Protein-Komponenten exprimieren, sowie Kits, die die erfindungsgemässen Protein-Komponenten auf DNA-Ebene in Form von geeigneten Expressionsvektoren und gegebenenfalls geeignete transizierbare bzw. infizierbare Zellen bereitstellen. Die bereitgestellten Zellen können gegebenenfalls einzelne erfindungsgemässe Protein-Komponenten stabil oder transient exprimieren.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02611

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/50 G01N33/68 C12Q1/37 C12N15/62 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATTHEAKIS LARRY C ET AL: "Expression of Cre recombinase as a reporter of signal transduction in mammalian cells" CHEMISTRY AND BIOLOGY (LONDON), vol. 6, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 835-844, XP002265769 ISSN: 1074-5521	48-51
A	abstract page 835, paragraph 1 -page 836, right-hand column page 841, right-hand column, last paragraph ----- -/--	1-25, 30, 32-47, 52-59

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 December 2003

Date of mailing of the international search report

13/01/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niebuhr-Ebel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 2611

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DUNNWALD M ET AL: "DETECTION OF TRANSIENT IN VIVO INTERACTIONS BETWEEN SUBSTRATE AND TRANSPORTER DURING PROTEIN TRANSLOCATION INTO THE ENDOPLASMIC RETICULUM" MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, BETHESDA, MD, US, vol. 10, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 329-344, XP008006622 ISSN: 1059-1524 abstract page 329, right-hand column, paragraph 2 -page 330, left-hand column, paragraph 1 ---	1-59
A	VIDAL M ET AL: "REVERSE TWO-HYBRID AND ONE-HYBRID SYSTEMS TO DETECT DISSOCIATION OF PROTEIN-PROTEIN AND DNA-PROTEIN INTERACTIONS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 93, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 10315-10320, XP000749719 ISSN: 0027-8424 abstract page 10316, right-hand column, paragraph 3 -----	35-59

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 2611

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/50 G01N33/68 C12Q1/37 C12N15/62 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MATTHEAKIS LARRY C ET AL: "Expression of Cre recombinase as a reporter of signal transduction in mammalian cells" CHEMISTRY AND BIOLOGY (LONDON), Bd. 6, Nr. 11, November 1999 (1999-11), Seiten 835-844, XP002265769 ISSN: 1074-5521 Zusammenfassung	48-51
A	Seite 835, Absatz 1 -Seite 836, rechte Spalte Seite 841, rechte Spalte, letzter Absatz --- -/--	1-25, 30, 32-47, 52-59



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Dezember 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/01/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Niebuhr-Ebel, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DUNNWALD M ET AL: "DETECTION OF TRANSIENT IN VIVO INTERACTIONS BETWEEN SUBSTRATE AND TRANSPORTER DURING PROTEIN TRANSLOCATION INTO THE ENDOPLASMIC RETICULUM"</p> <p>MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, BETHESDA, MD, US,</p> <p>Bd. 10, Nr. 2, Februar 1999 (1999-02),</p> <p>Seiten 329-344, XP008006622</p> <p>ISSN: 1059-1524</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>Seite 329, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 330, linke Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	1-59
A	<p>VIDAL M ET AL: "REVERSE TWO-HYBRID AND ONE-HYBRID SYSTEMS TO DETECT DISSOCIATION OF PROTEIN-PROTEIN AND DNA-PROTEIN INTERACTIONS"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US,</p> <p>Bd. 93, 1. September 1996 (1996-09-01),</p> <p>Seiten 10315-10320, XP000749719</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>Seite 10316, rechte Spalte, Absatz 3</p> <p>-----</p>	35-59